

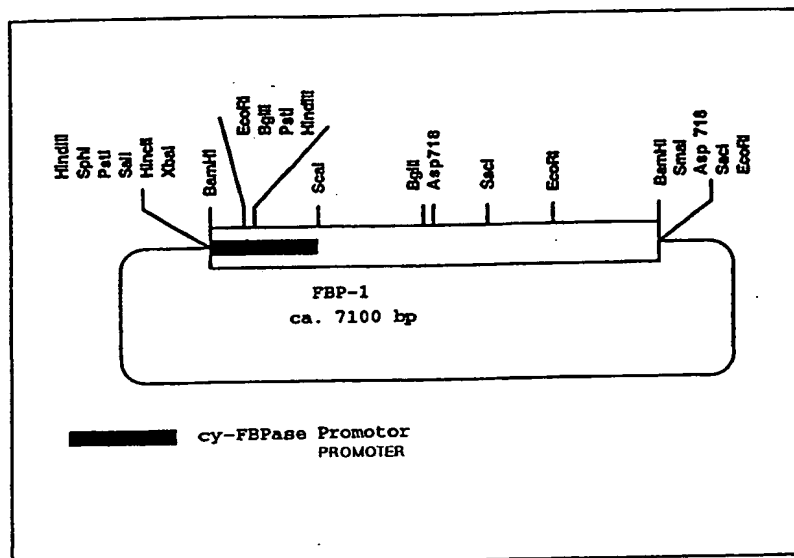
**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <p style="text-align: center; font-weight: bold;">C12N 15/55, 15/82, 1/21, A01H 5/00</p>	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/18940</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Mai 1998 (07.05.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05900 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Oktober 1997 (24.10.97)  (30) Prioritätsdaten: 196 44 478.0        25. Oktober 1996 (25.10.96)        DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Martha-Brautzsch-Strasse 7a, D-06467 Hoym (DE). EBNETH, Marcus [DE/DE]; Bicklingerweg 16, D-06484 Quedlinburg (DE). SCHMIDT, Ralf-Michael [DE/DE]; Gräfensteinstrasse 14, D-67434 Neustadt (DE).  (74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, Sternwartstrasse 4, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.          Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen          Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen          eintreffen.</i>

(54) Title: LEAF-SPECIFIC GENE EXPRESSION IN TRANSGENETIC PLANTS

(54) Bezeichnung: BLATTSPEZIFISCHE EXPRESSION VON GENEN IN TRANSGENEN PFLANZEN



(57) Abstract

Promoters are disclosed which cause the permanent, leaf-specific expression of a coding nucleotide sequence controlled by said promoters, for example a sequence which confers a specific resistance or increases the photosynthesis capacity.

Best Available Copy

# (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Promotoren, die in Pflanzen eine permanente, blattspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotid-Sequenz bewirken, beispielsweise einer Sequenz, die Resistenz oder eine Steigerung der photosynthetischen Leistungsfähigkeit vermittelt.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## BLATTSPEZIFISCHE EXPRESSION VON GENEN IN TRANSGENEN PFLANZEN

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäure-Sequenzen mit Promotoraktivität, die in Pflanzen eine blattspezifische Expression von ihnen kontrollierter codierender Nucleotid-Sequenzen bewirken, Expressionskassetten, rekombinante Vektoren und Mikroorganismen, die solche regulativen Sequenzen umfassen, damit transformierte transgene Pflanzen, ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen sowie ein Verfahren zur Isolierung des blattspezifischen Promotors.

10

- 15 Es ist bekannt, mittels gentechnischer Verfahren gezielt Fremd-gene in das Genom einer Pflanze zu übertragen. Dieser Prozeß wird als Transformation und die resultierenden Pflanzen werden als transgen bezeichnet. Transgene Pflanzen werden derzeit in unterschiedlichen biotechnologischen Bereichen eingesetzt. Die vor-
- 20 nehmlichen Ziele sind zum einen der Pflanzenschutz und zum anderen eine Qualitätssteigerung der erntbaren Produkte. Zur wirksamen Expression von Fremdgenen in Pflanzen sind Regulationssignale notwendig, die eine ordnungsgemäße Transkription ermöglichen. Hierzu gehören Promotoren und Terminatoren. Die am 3'-Ende der
- 25 kodierenden DNA befindlichen Terminatoren dienen der Beendigung der Transkription und gegebenenfalls als Signal zur Polyadenylierung der gebildeten mRNA. Promotoren enthalten Erkennungssequenzen für RNA-Polymerasen und für transkriptionale Effektoren. Die Promotoren sind für das Expressionsverhalten der Fremdgene ver-
- 30 antwortlich.

- Herbizidtolerante Pflanzen, wie sie aus der DE-A-3701623 bekannt sind, stellen ein Beispiel für gentechnische Pflanzenschutzmaßnahmen dar. Weitere Beispiele sind insektenresistente Pflanzen
- 35 (Vaek et al. (1987) Plant Cell 5, 159-169), virusresistente Pflanzen (Powell et al. (1986) Science 232, 738-743) und ozonresistente Pflanzen (Van Camp et al. (1994) BioTech. 12, 165-168). Beispiele für gentechnisch erzielte Qualitätssteigerungen sind: Erhöhung der Haltbarkeit von Früchten (Oeller et al. (1991)
- 40 Science 254, 437-439), Erhöhung der Stärkeproduktion in Kartoffelknollen (Stark et al. (1992) Science 242, 419), Veränderung der Stärke- (Visser et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225, 289-296) und Lipidzusammensetzung (Voelker et al. (1992) Science 257, 72-74) und Produktion pflanzenfremder Polymere (Poirer et al.
- 45 (1992) Science 256, 520-523).

Eine Vielzahl von Promotoren, die die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern, ist bekannt. Der am häufigsten verwendete Promotor ist der 35S CaMV-Promotor (Franck et al. (1980) Cell 21, 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungs-  
5 sequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al. (1989) EMBO J. 8, 2195-2202). Häufig werden auch induzierbare oder zell- oder gewebespezifische Promotoren eingesetzt.

10

Unter anderem wurden folgende Beispiele für eine induzierbare Expression beschrieben: Wundinduktion (DE-A-3843628, DE-B-3837752), chemische Induktion (Ward et al. (1993) Plant Molec. Biol. 22, 361-366) und Lichtinduktion (Fluhr et al. (1986)  
15 Science 232, 1106-1112).

Aus der DE-A-4207358 ist ein Promotor bekannt, der eine Schließzellen-spezifische Genexpression jedoch keine spezifische Expression in Mesophyllzellen oder epidermalen Zellen von Blättern be-  
20 wirkt. Durch künstliche Veränderung der Öffnungsperioden der Stomata kann der Gasaustausch entsprechend manipulierter Pflanzen wunschgemäß reguliert werden. Herbizidtoleranz oder -resistenz kann durch einen solchen Promotor nicht vermittelt werden.

25 Weitere Beispiele für zell- und gewebespezifische Expression sind: samen-, knollen- und fruchtspezifische (zusammengefaßt in Edwards und Coruzzi (1990) Annu. Rev. Genet. 24, 275-303; DE-A-3843627), phloemspezifische (Schmülling et al. (1989) Plant Cell 1, 665-670), wurzelknöllchenspezifische (DE-A-3702497) und  
30 meristemspezifische (Ito et al. (1994) Plant Molec. Biol. 24, 863-878) Expression. Beispiele für Promotoren in chloroplastenhaltigen Zellen sind gleichfalls aus Edwards und Coruzzi (1990), Annu. Rev. Genet. 24, 277-279 bekannt. Die darin beschriebenen Promotoren bewirken die Expression entweder nur in induzierbarer  
35 Form (z.B. der rbcS-3A-Promotor) oder nur in bestimmten Zelltypen (z.B. die GS2- und GS3A-Promotoren), jedoch ist die Expression nicht auf bestimmte Pflanzenteile beschränkt.

Die Verwendung der beschriebenen Promotoren ist oft problema-  
40 tisch. Promotoren, die eine konstitutive Expression der von ihnen kontrollierten Gene bewirken, können beispielsweise zur Erzeugung herbizidtoleranter und pathogenresistenter Pflanzen eingesetzt werden, haben aber den Nachteil, daß die Produkte der von ihnen kontrollierten Gene in allen Teilen der Pflanze vorliegen, auch  
45 in den geernteten Pflanzenteilen, was in manchen Fällen unerwünscht sein kann. Induzierbare Promotoren sind gleichfalls nicht unproblematisch, da die Induktionsbedingungen bei landwirtschaft-

lich genutzten Pflanzen im Freiland typischerweise schwer kontrollierbar sind.

In C3-Pflanzen führt der aus einer C4-Pflanze stammende Promotor der Phosphoenolpyruvat Carboxylase zu Expression im Mesophyll des Blattes (Stockhaus et al., (1994), Mol. Gen. Genet. 245, 286-293). Dieser Promotor vermittelt im Mesophyll jedoch nur niedrige Aktivität. Außerdem zeigt er in Wurzeln ebenfalls Aktivität. Diese geringe Organspezifität ist für viele Anwendungen unerwünscht.

Promotoren, die eine blattspezifische, vorzugsweise permanente Expression von Genen, die von ihnen kontrolliert werden, bewirken, sind nicht bekannt.

Es wäre deshalb wünschenswert, Wege zu finden, Gene unter Umgehung dieser Nachteile in Pflanzen zu exprimieren.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, die eine gezielte organspezifische Genexpression in Pflanzen ermöglichen. Diese Mittel sollten beispielsweise zur Expression von Resistenzgenen und die Photosyntheseleistung modifizierenden Genen geeignet sein.

Diese Aufgabe wurde überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung eines neuen Promotors, der in Pflanzen eine, vorzugsweise permanente, blattspezifische Expression einer von ihm kontrollierten codierenden Nucleotid-Sequenz unabhängig von Induktionsfaktoren bewirkt.

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

Figur 1 (A) eine schematische Darstellung des in den Vektor pUC19 klonierten ca. 7100 bp umfassenden BamHI-Fragmentes des Klons FBP-1 aus Kartoffel. Der cytosolische FBPase(cy-FBPase)-Promotorbereich ist schwarz hervorgehoben; (B) das Konstruktionsschema von Plasmid FBP:pBlue;

Figur 2 die Nucleotidsequenz des cy-FBPase-Promotors aus Kartoffel. Der zum 3'-Ende des für die Southernhybridisierung verwendeten 5'-Subfragmentes der cy-FBPase komplementäre Bereich ist unterstrichen; zwei palindromische Sequenzabschnitte sind punktiert unterstrichen; die 5'-terminale Sequenz "GGATC" wurde zur Erzeugung einer BamHI-Schnittstelle an die genomische DNA angefügt;

- Figur 3 (A) das Konstruktionsschema der Plasmide FBP:GUS und FBP:GUS(DEL); (B) eine schematische Darstellung des Plasmids FBP:GUS, mit dem ca. 1700 bp umfassenden FBPase-Promotor, dem ca. 1870 bp umfassenden GUS-Gen und dem ca. 260 bp umfassenden Nopalinsynthase Terminator, inseriert in Vektor pBI 101;
- Figur 4 ein Balkendiagramm, das die durch den cy-FBPase-Promotor kontrollierte blattspezifische GUS-Aktivität in transgenen Kartoffelpflanzen belegt; es werden die für zwei verschiedene Transformationsexperimente mit FBP:GUS ermittelten Resultate (Pflanzenlinie "Me 1-22" und "Me 1-9") gezeigt und mit einem Kontrollversuch ("Kontrolle") verglichen;
- Figur 5 ein Balkendiagramm, das die durch den cy-FBPase-Promotor kontrollierte, blattspezifische GUS-Aktivität in transformierten Tabakpflanzen belegt. "TME-1/67" bezeichnet die mit dem Vektor FBP:GUS erzielten Resultate. "TME-11/13" bezeichnet die mit dem Vektor FBP:GUS(DEL) erzielten Resultate. "WT" zeigt die für den Wildtyp ermittelten Resultate. Angegeben ist die Menge gebildetes 4-Methyl-umbelliferon pro Milligramm Protein, pro Minute;
- Figur 6 den histochemischen Nachweis der GUS-Aktivität in verschiedenen Geweben des Tabakblattes einer transgenen Pflanze. (A) Querschnitt durch das zentrale Leitgewebe des Source-Blattes, (B) Epidermis, (C) Querschnitt durch die Petiole, (D) Querschnitt durch das Mesophyll eines Source-Blattes. Die Schnitte wurden 20 min in 3%iger Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert. Danach wurde das Chlorophyll durch 70%iges Ethanol entfernt;
- Figur 7 einen Northern-blot, der die gleichmäßige blattspezifische GUS-Expression in transgenen Tabakpflanzen, vermittelt durch den cy-FBPase-Promotor aus Kartoffel, belegt;
- Figur 8 einen histochemischen Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase(GUS)-Aktivität in Tabakkeimlingen;
- Figur 9 eine schematische Darstellung des Plasmides pBin-FBP, mit dem 1724 bp umfassenden cy-FBPase-Promotor aus Kartoffel und dem 280 bp umfassenden Octopin-Synthase Terminator, inseriert in Vektor pBin 19; und
- Figur 10 cDNA-Sonde des cy-FBPase Gens aus Kartoffel (EMBL-Nr.: X76946).

Der Begriff "Gen" bzw. "codierende (Nucleotid-)Sequenz" bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Nucleotid-Sequenz, die eine bestimmte, gegebenenfalls vererbare, Struktur, beispielsweise wenigstens ein Protein, wenigstens ein Ribozym oder wenigstens eine Antisense-RNA; oder Funktion, wie beispielsweise

Resistenz, codiert; oder eine Änderung der Zusammensetzung pflanzlicher Inhaltsstoffe, wie Öle, Fette, Enzyme, Proteine, Biopolymere, bewirkt, so dass z. B. der Nährwert, der Ernteertrag oder die industrielle Nutzbarkeit der Pflanze verbessert wird.

5

Ein "Promotor" bezeichnet erfindungsgemäß einen Nucleotidsequenzbereich, welcher die Transkription eines Gens, bzw. die Synthese der entsprechenden mRNA steuert. Der Promotor umfasst eine Sequenz, die 5'-stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegt.

- 10 Sie umfasst als wesentliches Sequenzelement wenigstens die sogenannte "TATA"-Box. Weitere regulative Elemente, wie die "CAAT"-Box oder eine GC-Box können ebenfalls enthalten sein. Darüber hinaus kann es erforderlich sein, dass die erfindungsgemäße Promotorsequenz zusätzlich zu dem oben genannten Sequenzabschnitt
- 15 eine 3'-stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt gelegene Sequenz, wie z. B. eine Leadersequenz oder einen Teilbereich davon aufweist, um die gewünschte Promotor-Aktivität und/oder -Spezifität zu zeigen oder voll zu entfalten.

- 20 "Resistenz" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich induzierte Resistenz oder Toleranz der transgenen Pflanzen gegen Herbizide und/oder Pathogene, wie z.B. Pilze, Viren oder Insekten, gegen bestimmte äußere Bedingungen, wie hohe Konzentrationen an Ozon, Schwefeldioxid, Stickoxiden oder anderen
- 25 exogenen Schadstoffen sowie gegen Hitze, Kälte, Trockenheit oder UV-Licht.

- Eine "Modifikation der Photosyntheseleistung einer Pflanze" umfasst die Verringerung und insbesondere die Erhöhung der photosynthetischen Aktivität der transformierten Pflanzen. Dies kann
- 30 beispielsweise dadurch erfolgen, daß man Gene exprimiert, welche gezielt die Lichtausbeute der Pflanze erhöhen, die Umsatzgeschwindigkeit einzelner geschwindigkeitsbestimmender Stoffwechselschritte erhöhen, oder den Stoffaustausch mit der Umgebung be-
- 35 einflussen.

- "Blattspezifität" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß ein unter der Kontrolle eines erfindungsgemäßen Promotor stehendes Fremdgen im gesamten Blattorgan oder in bestimmten Geweben
- 40 des Blattes, vorzugsweise im Mesophyll (z.B. Palisadenparenchym) exprimiert wird, nicht aber im Sproß oder in anderen Pflanzenteilen wie insbesondere den Wurzeln. Insbesondere ist "Blattspezifität" im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch dann gegeben, wenn der erfindungsgemäße Promotor die Expression eines Fremdgens im
- 45 Blatt, vorzugsweise im Mesophyll von Blättern, insbesondere von Source-Blättern, im Vergleich zu anderen Pflanzenteilen, wie Stamm, nichtkeimenden Knollen, Früchten oder Samen der Pflanze

begünstigt und in Blättern eine signifikant, wie z. B. mindestens etwa 5 bis 10-fach, wie etwa 10- bis 100-fach, erhöhte Expression bewirkt.

- 5 "Source-Blätter" einer Pflanze sind die älteren Blätter einer Pflanze, welche im Überschuss Kohlenstoff durch Photosynthese fixieren und somit gebundenen Kohlenstoff in andere Pflanzenteile, wie z. B. die jüngeren "Sink"-Blätter, exportieren.
- 10 Eine "permanente" Expression bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die von exogen applizierten chemischen Induktionssignalen im wesentlichen unabhängige über eine oder mehrere Pflanzengenerationen andauernde Expression des unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors stehenden Gens.
- 15 Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Promotoren, die in Pflanzen eine, vorzugsweise permanente, blattspezifische Expression von ihnen kontrollierter kodierender Nucleotidsequenzen bewirken.
- 20 Der primäre Wirkort von Herbiziden und einer Vielzahl von Pathogenen ist das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression der entsprechenden Resistenzgene ausreichenden Schutz bieten würde. Da die Photosynthese gleichfalls im Blattgewebe abläuft,
- 25 wäre zur Modifikation und insbesondere zur Verbesserung der photosynthetischen Leistungsfähigkeit die blattspezifische Expression eines oder mehrerer, die Photosyntheseleistung beeinflussender Gene notwendig.
- 30 Die erfindungsgemäßen Promotoren bieten nun den überraschenden Vorteil, Resistenzgene spezifisch am eigentlichen Wirkort in der Pflanze exprimieren zu können. Andererseits ist die gezielte Beeinflussung der Photosyntheseleistung mit den erfindungsgemäßen Promotoren erstmals möglich. Wie die Versuchsergebnisse überraschenderweise belegen, ermöglichen bevorzugte Promotoren erstmals
- 35 die spezifische Lokalisierung und Expression eines Fremdgens im Mesophyll von Blättern, insbesondere von Source-Blättern, während im parenchymatischen Gewebe, sowie Xylem, Phloem und anderen keine Aktivität zu beobachten ist.
- 40 Ein erfindungsgemäßer Promotor kann durch Isolierung und Charakterisierung von Promotoren blattspezifisch und vorzugsweise permanent exprimierter Gene bereitgestellt werden. Bevorzugt sind Promotoren, die im wesentlichen den Promotoren der cytosolischen
- 45 Fructose-1,6-Bisphosphatase-Gene (cy-FBPase-Gene) aus blattspezifischen Mesophyllzellen von Pflanzen entsprechen. Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäß cy-FBPase Promotoren, die aus blatt-



spezifischen Mesophyllzellen von Pflanzen der Gattung Solanum (Kartoffel) isoliert wurden, sowie funktionelle Äquivalente davon. Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft eine Nucleotid-Sequenz mit der gewünschten Promotoraktivität, die aus Solanum tuberosum var. Desiree isoliert wird, oder funktionelle Äquivalente davon. Insbesondere bevorzugt ist ein Promotor mit einer Nucleotidsequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO: 1 bis 5, oder funktionellen Äquivalenten dieser Sequenzen.

- 10 Der Transkriptionsstart in der bevorzugten Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 1 wurde mit Hilfe von "Primer Extension" am A.L.F. (Automatic Laser Fluorescence DNA Sequenzer (Pharmacia)) festgelegt. Dazu wurde ein 5'-fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid angefertigt, das zu einer 21 bp langen Region im Promotor von +1577 bis +1599 (SEQ ID NO: 1) komplementär ist. Mit Hilfe dieses Primers wurde Gesamt-RNA aus Source-Blättern in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die nicht durch den Primer erkannte RNA sowie die RNA-Anteile der cDNA/RNA-Hybride wurden anschließend verdaut. Die cDNA wurde dann am A.L.F. gleichzeitig mit der mit dem gleichen
- 20 Primer sequenzierten Promotor DNA analysiert. Der Transkriptionsstart konnte durch Vergleich der Signale im Sequenzgel identifiziert werden. Die Sequenz SEQ ID NO: 1 umfasst demnach 1428 bp Promotorregion (SEQ ID NO: 4) und 292 bp 5'-untranslatierten Bereich der cyt FBPase. 30 bp oberhalb des Startpunktes konnte eine
- 25 TATA-Box-Sequenz gefunden werden ("TTATAAA"), sowie 141 bp oberhalb des Startpunktes eine CAAT-Box ("ATCATCCAAACAT"). Außerdem wurden mehrere invertierte und direkte Sequenzwiederholungen festgestellt, die keine Homologien zu Sequenzwiederholungen aufweisen, die in anderen Promotoren gefunden wurden.

30

Die ermittelten direkten und invertierten Sequenzwiederholungen mit einer Länge von mindestens 10bp sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

35

40

45

## Direkte Sequenzwiederholungen

	Fragment ab Base	Repeat ab Base	Größe	Repeat Sequenz 5' 3'
5	225	1316	10	AAGGATATTT
	269	1686	11	TCTTTTTTTTTT
	825	1016	12	TCAAAAGTTATG
	1039	1493	13	ATATGTGACGTGG
10	1083	1535	11	ATAGAAACAAA
	1085	1411	10	AGAAACAAAA
	1172	1608	12	GTGCCAACCCT
	1203	1639	13	CTCTTCCACGTG

## 15 Invertierte Sequenzwiederholungen

	Fragment ab Base	Repeat ab Base	Größe	Repeat Sequenz 5' 3'
20	99	293	10	CAAACATTTT
	275	275	10	TTTTTAAAAA
	313	1132	10	AACTTCTGTT
	535	535	10	TGCATATGCA
25	835	835	10	TGCAGCTGCA
	1269	1370	11	TGTATATCAAA
	1293	1359	10	TCATCCAAAC
	1401	1401	10	TTTTTAAAAA
	1658	1658	12	TCTGACGTCAGA

- 30 Die Positionsangaben basieren jeweils auf der Nummerierung der Nucleotidreste gemäß SEQ ID NO:2.

- Obige Auflistung enthält insbesondere zwei 10 bp umfassende fast identische palindromische Sequenzabschnitte, die je zweimal das
- 35 Motiv TGCA enthalten. Dieses Motiv liegt im Gegenstrang als ACGT vor, einer Box, die von verschiedenen Arbeitsgruppen als regulatorische Sequenz (z. B. Guliano et al., (1988), Proc. Acad. Natl. Sci. USA, 85, 7089-7093) und als Bindestelle für DNA-bindende Leucin-Zipper-Proteine (z. B. Armstrong et al., (1992), Plant
- 40 Cell, 4, 525-537) identifiziert worden ist. Die Bindung von Leucin-Zipper-Proteinen ist durch die Orientierung des Motivs wahrscheinlich nicht beeinflusst. Diese Sequenzen sind durch punktierte Unterstreichungen in Figur 2 markiert. Der Einfluss obiger Teilsequenzen auf die erfindungsgemäße Promotoraktivität und/oder
- 45 -spezifität kann vom Fachmann z.B. anhand üblicher Deletionsexperimente überprüft werden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft eine 5'-verkürzte Promotorsequenz (SEQ ID NO: 3). Sie umfasst eine 817 bp Promotorregion (SEQ ID NO: 5) sowie einen 292 bp 5'-untranslatierten Bereich. Der verkürzte Promotor zeigt überraschenderweise eine identische Organ- bzw. Gewebespezifität, wie der oben beschriebene längere Promotor, besitzt jedoch unterschiedliche Promotoraktivität.

Funktionell äquivalente Promotorsequenzen sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nucleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen, i. e. Promotoraktivität und Gewebe- oder Organspezifität besitzen. Ein Maß für die Promotoraktivität ist beispielsweise die für ein bestimmtes Markergen, das unter der regulativen Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors steht, ermittelte Expressionsrate. Beispiele für geeignete Markergene sind das  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Gen aus E. coli oder das Green-Fluorescence-Protein (GFP)-Gen (Baulcombe et al., (1993), Plant J., 7 (6), 1045-1053). Die Organ- bzw. Gewebespezifität lässt sich leicht durch Vergleich der an einzelnen Geweben bzw. Organen der Pflanze ermittelten Expressionsraten für obige Markergene bestimmen. Funktionelle Äquivalente umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an die Codon-Usage einer Pflanze angepaßte, künstliche Nucleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Promotorsequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nucleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 5 erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen Promotorsequenz, oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Promotorvarianten, deren Promotorfunktion, verglichen mit dem Wildtyp, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Gegebenenfalls müssen vor der Isolierung der Promotorsequenz zunächst blattspezifisch exprimierte Gene experimentell, beispielsweise durch subtraktive Hybridisierung (bekannt aus R.A. Meyers, Molecular Biology and Biotechnology (1995), VCH, S. 698-699) identifiziert werden. Als nächstes kann eine genomische Bank aus

- Blättern des Donororganismus nach bekannten Verfahren erstellt werden, z.B. durch Isolierung der Gesamt-DNA, nachfolgendem Partialverdau, Verpackung von Fragmenten mit definierter Größe in Bakteriophagen, Infektion von Bakterien mit den rekombinanten
- 5 Bakteriophagen und anschließende Amplifikation der genomischen Bank. Die die genomische DNA enthaltenden Phagen können dann beispielsweise auf Nylonfilter transferiert und mit einer radioaktiv markierten cDNA des zuvor identifizierten blattspezifischen Gens hybridisiert werden. Hybridisierende Phagen-DNAs können durch Au-
- 10 toradiographie sichtbar gemacht und danach vereinzelt werden. Zur Isolierung der Phagen-DNA können, ausgehend von je einem Einzelplaque, lytische Agarplatten angeimpft und inkubiert und die DNA in an sich bekannter Weise, z.B. durch Phenol-Chloroform-Extraktion und nachfolgende Fällung mit Ethanol, gewonnen werden. Die
- 15 Fragmentlängen der Promotorbereiche der isolierten genomischen Klone können nun beispielsweise durch Southern Hybridisierungen mit einer 5'-cDNA-Probe des blattspezifisch exprimierten Gens nach unterschiedlichen Restriktionsspaltungen bestimmt werden. Ein Promotorbereich kann nun in einen geeigneten Vektor kloniert,
- 20 beispielsweise in *E. coli* vermehrt und die komplette Nucleotid-Sequenz des Promotors durch Sequenzierung bestimmt werden. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184.
- 25 Zweckmäßigerweise kann der Promotor nun in einer Expressionskassette mit einem geeigneten Gen operativ verknüpft werden, so daß der Promotor die Transkription des mit ihm fusionierten Gens kontrollieren kann. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz,
- 30 Terminator und gegebenenfalls weiteren regulativen Elementen, wobei jedes der genannten Elemente seine Funktion bei der Genexpression bestimmungsgemäß erfüllen kann.
- Eine solche Expressionskassette stellt einen weiteren Gegenstand
- 35 der vorliegenden Erfindung dar. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Vektoren, z.B. Plasmide oder Viren, die wenigstens eine erfindungsgemäße Expressionskassette enthalten.
- 40 Grundsätzlich können die Nucleotid-Sequenzen, die der Promotorsequenz der Expressionskassette nachgeschaltet werden, alle möglichen offenen Leseraster für ein beliebiges Peptid sowie ein oder mehrere Introns enthalten. Als Beispiele seien genannt: Sequenzen für Enzyme; Sequenzen, die komplementär sind zu a) einer
- 45 Genomsequenz, wobei die Genomsequenz ein offenes Leseraster sein darf; b) einem Intron; c) einer nicht kodierenden Leitsequenz; d) jeder Sequenz, die - komplementär in das Genom integriert - die

Transkription, mRNA-Verarbeitungen (z.B. Splicing) oder die Translation inhibiert.

Die insertierte Nucleotid-Sequenz kann synthetisch hergestellt  
5 oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nucleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt  
10 werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies expri- miert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nucleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster  
15 ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die  
20 Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb  
25 der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremd- artig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrich-  
30 tung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnitt-  
35 stellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restrik- tionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Trans- versionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer- repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigne-  
40 ten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

45 Besonders geeignete codierende Nucleotid-Sequenzen sind Toleranz- oder Resistenz-vermittelnde Gene, Gene, die die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Pflanze erhöhen oder Markergene, wie das

β-Glucuronidase-Gen (GUS) aus *Escherichia coli*. Geeignete Toleranzgene sind beispielsweise solche, die die Temperatur-, Trocken- oder UV-Toleranz oder die Toleranz gegenüber Umweltschadstoffen einer Pflanze erhöhen. Geeignete Resistenzgene sind beispielsweise das bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*, das Resistenz gegen das Totalherbizid Phosphinothricin vermittelt, Chitinase-Gene, die Toleranz gegen Pilzinfektionen vermitteln und Ribozym-Gene, deren RNA-Transkripte virale RNA mit hoher Spezifität erkennen und spalten können. Diese und andere Resistenzgene sind aus *Transgenic Plants and Crop Improvement*, in *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.-d Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, Part III, S. 243-372; sowie aus R.H. Symons (1992), *Small catalytic RNAs*, *Ann. Rev. Biochem.* 61, 641-671 bekannt. Geeignete Gene zur Erhöhung der photosynthetischen Leistungsfähigkeit sind beispielsweise die für Saccharosephosphat-Synthase (SPS) oder Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) codierenden Gene.

Das fusionierte Konstrukt kann nun durch verschiedene bekannte Verfahren in pflanzliche Genome transferiert werden. Geeignete Verfahren sind beispielsweise Protoplasten-Transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Elektroporation, Sonikation oder Mikroinjektion sowie die Transformation intakter Zellen oder Gewebe durch Mikro- oder Makroinjektion in Gewebe oder Embryonen, Gewebeelektroporation, Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, biolistischer Gentransfer und besonders bevorzugt *Agrobacterium*-Transformation. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*; in *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.-d Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42, 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das fusionierte Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1980) *Nucl. Acids Res.* 12, 8711). Solche Vektoren und mit ihnen transformierte Mikroorganismen, insbesondere *Agrobacterium* sind weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung.

Mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte *Agrobakterien* können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weispecies, verwendet werden, z.B. indem verwundete

Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

- Die Verwendung erfindungsgemäßer Vektoren zur Transformation von
- 5 Pflanzen ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.-d Kung und R. Wu, Academic Press, 1993,
- 10 S. 15-38 und aus S.B. Gelvin, Molecular Genetics of T-DNA Transfer from Agrobacterium to Plants, gleichfalls in Transgenic Plants, S. 49-78. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die unter Kontrolle des eingeführten
- 15 Promotors das mit diesem fusionierte Gen blattspezifisch exprimieren. Solche transgenen Pflanzen, Vermehrungsgut davon sowie Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
- 20 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht
- 25 von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.
- 30 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

- Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-1 Blue und P2 392) wurden durch die Firma Stratagene bezogen. Der zur
- 35 Pflanzentransformation eingesetzte Agrobacterium tumefaciens Stamm (C58C1 mit dem Plasmid pGV 3850kan) wurde von Debleare et al. (1985, Nucl. Acid Res. 13, 4777) beschrieben. Zur Klonierung wurden die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron (1985) Gene 33, 103-119), pBlueScript SK (Stratagene), pBin19 (Bevan (1984) Nucl.
- 40 Acids Res. 12, 8711-8720) und pBI101 (Jefferson et al. (1987) EMBO J. 6, 3901-3907) verwendet.

Solanum tuberosum L Varietät Désirée wurde bezogen von Vereinigte Saatzuchten eG Ebstorf.

- 45 Nicotiana tabacum L Samsun NN wurde bezogen von Vereinigte Saatzuchten eG Ebstorf.

## Beispiel 1: Isolierung eines blattspezifischen Promotors

## 1. Isolierung eines blattspezifisch exprimierten Gens

## 5 1.1. Verwendete Sonde

Eine mit reverser Transkriptase erzeugte cDNA-Sonde des cy-FBPase-Gens aus Kartoffel (EMBL-Nr.: X76946) wurde für die im folgenden beschriebenen Experimente verwendet. Die cDNA-Sonde  
10 (Figur 10) umfasste 1487 Nucleotide. Die für das Strukturgen (FBPase) kodierende Region umfaßt die Nucleotide 199 bis 1218.

## 1.2. Erstellung einer genomischen Bank

15 Zur Erstellung einer genomischen Bank aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* var. Desiree) wurde Gesamt-DNA aus Kartoffelblättern nach der von Rogers et al. ((1985) Plant Mol. Biol. 5, S. 69-76) beschriebenen Methode isoliert. Anschließend wurden 300 µg der DNA mit dem Restriktionsenzym Sau3A partialverdaut und die Fragmente  
20 zwischen 12 und 20 kb mittels Saccharosegradientenzentrifugation isoliert, dialysiert und durch Ausschütteln mit Butanol konzentriert.

Die DNA wurde in von Stratagene (11099 North Torrey Pines Road,  
25 La Jolla, CA 92037, USA) bezogene BamHI verdaute EMBL3-Arme nach Herstellerangaben ligiert und anschließend in vitro verpackt (Gigapack II Gold Verpackungsextrakte, Stratagene, nach Herstellerangaben). E. coli Bakterien des Stammes P2 392 (Stratagene) wurden mit den rekombinanten Lambdaphagen infiziert, der Titer  
30 der Bank bestimmt und anschließend die Bank amplifiziert.

## 1.3. Screenen der genomischen Bank und Isolierung des cy-FBPase Gens

35 Zur Isolierung eines das cy-FBPase Gen umfassenden genomischen Klons wurden  $3 \times 10^5$  Phagen plattiert. Nach Transfer der Phagen auf Nylonfilter (Hybond N, Amersham Buchler) wurden die Filter zur Fixierung 2 Stunden bei 80°C gebacken. Anschliessend wurden sie bei 42°C in Hypo-Hybond-Puffer prähybrisiert.

40

1 l Hypo-Hybond-Puffer enthält:

250 ml 1M Natriumphosphatpuffer pH 7,2

50 ml 5M NaCl

2 ml 0,5M EDTA pH 8,0

45 2 ml Heringssperma-DNA sonifiziert 1 mg/l

400 ml Formamid

50 g PEG 6000



70 g SDS  
200 ml Wasser

- Die mit High-Prime (Boehringer Mannheim) radioaktiv markierte
- 5 Probe der cy-FBPase aus Kartoffel wurde nach 5 minütiger Denaturierung bei 95°C in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die Filter wurden über Nacht bei 42°C hybridisiert. Nach Abziehen der radioaktiven Hybridisierungslösung wurden die Filter 20 min bei 42°C in 2X SSC (einem NaCl/NaCitrat-Puffer), 0,1% SDS gewaschen. Anschließend
- 10 schliessend wurde erneut 20 min bei gleicher Temperatur mit 1X SSC, 0,1% SDS gewaschen. Danach wurde ein Film auf die Filter aufgelegt und über Nacht bei -70°C exponiert.

- Es wurden 4 hybridisierende Phagen-DNAs durch Autoradiographie
- 15 sichtbar gemacht und vereinzelt. Ausgehend von je einem Einzelplaque wurde je eine lytische Agarplatte angeimpft, über Nacht bei 37°C inkubiert und die Phagen am nächsten Tag mit 10 ml Phagenpuffer (SM) abgeschwemmt. Anschließend wurde der Phagenüberstand mit Chloroform versetzt und die Bakterien wurden abzentrifugiert. Zum Überstand wurden je eine Spatelspitze DNase und
- 20 RNase gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 0,5 M EDTA und 200 µl 10%-iger SDS-Lösung wurde der Ansatz für weitere 20 Minuten bei 65°C inkubiert. Dann wurden 4,5 ml 3M Kaliumacetatlösung pH 4,8 zugegeben, der Ansatz gemischt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 25:24:1) ausgeschüttelt. Nach Extraktion wurde die DNA durch Zugabe von zwei Volumina
- 25 Ethanol aus dem Überstand gefällt und das erhaltene Sediment in 600 µl TE-RNase gelöst.

30

## 2. Lokalisierung des Promotors

- Die Fragmentlängen der Promotorbereiche der 4 isolierten Klone wurden durch Southernhybridisierungen mit einer 5'-cDNA-Probe
- 35 nach unterschiedlichen Restriktionsspaltungen bestimmt. Klon FBP-1 wurde für weitere Analysen ausgewählt. Ein ca. 7100 b BamHI-Fragment des Klons FBP-1 wurde zur weiteren Charakterisierung in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 kloniert. Durch Sequenzierung, Southernhybridisierung und Restriktionsanalyse
- 40 konnte der Promotorbereich auf ein 1724 Basenpaar-Fragment eingeschränkt werden (Figur 1A). Als Sonde für die Southernhybridisierung dienten die 5'-342 bp (*HincII*/*EcoRI*) und 3'-216 bp (*EcoRI*/*EcoRV*) Subfragmente der cDNA der cy-FBPase. Aus der Sequenz der cDNA der cytosolischen FBPase war bekannt, daß das Restriktions-
- 45 enzym *ScaI* im nicht kodierenden 5'-Bereich der cDNA schneidet. Im genomischen Klon FBP-1 war eine singuläre *ScaI*-Schnittstelle zu finden. Durch die Sequenzinformation über den genomischen Klon

konnte gezeigt werden, daß es sich hierbei um die der cDNA entsprechende Schnittstelle handelte. Sie wurde benutzt, um den Promotorbereich von der kodierenden Region abzutrennen. Dazu wurde die Promotorregion *XbaI/ScaI* aus dem Klon FBP-1 ausgeschnitten, die Enden aufgefüllt und in den Vektor pBlueScript-SK (pBSK-) ligiert, der zuvor *SpeI* geschnitten und aufgefüllt worden war (Bezeichnung FBP:pBlue). Die Herstellung von FBP:pBlue ist in Figur 1B schematisch dargestellt. Anschliessend wurde die komplette DNA-Sequenz durch Sequenzierung bestimmt (Figur 2).

10

#### Beispiel 2: Herstellung eines Transformationsvektors

##### 1. Herstellung des Plasmids FBP:GUS

Die Expressionseigenschaften des neuen Promotors wurden durch Markergenexperimente analysiert. Zu diesem Zweck wurde der cy-FBPase-Promotor mit dem  $\beta$ -Glucuronidase-Gen (GUS) aus *E. coli* fusioniert. Der Promotor wurde als *BamHI*-Fragment aus dem Plasmid FBP:pBlue isoliert und in die *BamHI*-Schnittstelle des Expressionsvektors pBI101 kloniert (Figur 3A) (Jefferson et al., (1987), EMBO J. 6, 3901-3907). Das resultierende Plasmid FBP:GUS (Figur 3B) wurde anschließend zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt.

##### 2. Herstellung des Deletionskonstruktes FBP:GUS(DEL)

Es wurde ein Deletionskonstrukt hergestellt, das etwa 1,1 kb der Promotorsequenz umfasst. Dazu wurde aus FBP:GUS mittels *EcoRI*-Verdau ein Fragment ausgeschnitten, das das GUS-Gen, den NOS-Terminator sowie 1100 bp des Promotors umfasst. Dieses Fragment wurde isoliert, gereinigt und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pBin 19 ligiert (Figur 3A). Die Orientierung des Fragments im pBin 19 wurde durch Spaltung mit *BamHI* überprüft. Mit diesem Vektor wurde *Agrobacterium tumefaciens* ebenfalls transformiert.

35

#### Beispiel 3: Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB-Medium (Vervliet et al., J. Gen. Virol. (1975) 26, 33).

45

Beispiel 4: Transformation des cy-FBPase-Promotors in Tabak- und Kartoffelpflanzen und Analyse der Expression

1.1. Tabaktransformation

- 5 Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von mit FBP:GUS bzw. FBP:GUS(DEL) transformiertem *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verwor-
- 10 fen, und die Bakterien im gleichen Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakterienlösung gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 15,473) mit 2% Saccharose und 0,8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Clarofan, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthylelessigsäure (NAA), 1,6% Glukose und 0,8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden
- 20 Licht/ 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Clarofan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

1.2. Kartoffeltransformation

- 25 20 kleine, mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur wurden in 10 ml MS-Medium mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 µl einer mit FBP:GUS bzw. FBP:GUS(DEL) transformierten, unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens* Übernachtskultur enthielt. Nach 5 minütigem, leichtem Schütteln wurden die
- 30 Petrischalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 2 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 500 mg/l Clarofan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei
- 35 25°C und 3000 LUX wurde die Clarofankonzentration im Medium halbiert. Eine weitere Kultivierung erfolgte nach bekannten Methoden (Rocha-Sosa et al. (1989) *EMBO J.* 8, 23-29).

1.3. Expressionsanalyse des cy-FBPase-Promotors in transgenen

- 40 Tabak- und Kartoffelpflanzen

Von den transformierten Tabak- und Kartoffelpflanzen wurden jeweils 60 transformierte Pflanzen regeneriert und die  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität bestimmt. Der  $\beta$ -Glucuronidasenachweis erfolgte wie

45 von Martin et al. (1992) in: *The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression in: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*, Academic Press, S. 23-43 be-

schrieben. Zur genaueren Analyse der Expression wurden 40 Tabakpflanzen und 21 Kartoffelpflanzen ausgewählt. Nach Transfer der transformierten Pflanzen in das Gewächshaus wurde die organspezifische Expression der  $\beta$ -Glucuronidase bestimmt.

5

In Figur 4 ist ein Vergleich der Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Kartoffelgeweben dargestellt. Aus den Daten wird ersichtlich, daß der Promotor eine blattspezifische Expression des Reportergens vermittelt.

10

In Figur 5 wird die GUS-Aktivität in verschiedenen Organen vom Wildtyp und transgenen Tabakpflanzen verglichen, die das GUS-Gen unter der Kontrolle verschiedener erfindungsgemäßer Promotoren tragen. TME-1/67 bezeichnet eine mit FBP:GUS transformierte

15 Pflanze. TME-11/13 bezeichnet eine mit FBP:GUS(DEL) transformierte Pflanze.

Die Bestimmung der GUS-Aktivität in den Organen Sink- und Source-Blatt, Stamm und Wurzel von 9 Wochen alten Tabakpflanzen sowie

20 Samen ergab, dass in beiden Transformationslinien die höchste Aktivität in Source-Blättern zu finden ist, in Sink-Blättern eine deutlich geringere. Die Messwerte in Sink-Blättern waren innerhalb eines Blattes stets sehr unterschiedlich. Die Aktivität in Stamm und Wurzel lag nur unerheblich über der Hintergrundaktivität, die in Wildtyptabak gemessen wurde. Der Promotor ist in diesen Geweben nicht aktiv. In Tabaksamen konnte im Vergleich zu Samen des Wildtyps leicht erhöhte Aktivitäten gemessen werden, obwohl im "Northern-Blot" keine mRNA nachzuweisen war. Die GUS-Aktivität in Samen wurde auch bei Inkubation von Samenhomogenat in

25 X-Gluc-Lösung gefunden. Wildtyp-Samen zeigten hier keine Färbung (nicht gezeigt). Möglicherweise ist der Promotor im Verlauf der Samenentwicklung aktiv und nicht in den reifen Samen selber. Die GUS-Aktivität könnte auf gespeichertes Protein zurückzuführen sein. Je nach Pflanze war in den Blättern eine um einen Faktor

30 von etwa 10 bis 50 erhöhte Aktivität im Vergleich zum Samen feststellbar.

In Figur 6 wird die Zellspezifität des erfindungsgemäßen Konstruktes FBP:GUS veranschaulicht. Identische histologische Be-

40 funde erhält man mit dem verkürzten Promotorkonstrukt

FBP:GUS(DEL). Um die Zellspezifität des cyt FBPase-Promotors im Blatt genauer zu untersuchen, wurden Blatt-Querschnitte von voll entfalteten Tabakblättern im Gewächshaus gezogener 8 Wochen alter Pflanzen angefertigt. Die Schnitte wurden in 3%igem Paraformaldehyd für 20 min fixiert, über Nacht in X-Gluc(5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid)-Lösung gefärbt und anschließend das Chlorophyll mit 7%-igem Ethanol entfernt. Zusätzlich wurde die Epider-

mis vom Mesophyll abgezogen und getrennt inkubiert, um Kontaminationen durch Dibrom-dichlor-indigo, das von beschädigten Mesophyllzellen in die Färbelösung abgegeben worden war, zu vermeiden.

5

In Figur 6 (A) ist ein Querschnitt durch das zentrale Leitgewebe eines Source-Blattes gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass im zentralen Leitgewebe nur die Mesophyllzellen an der Oberseite gefärbt waren. Das parenchymatische Gewebe, sowie Xylem, Phloem und andere hier lokalisierte Gewebe waren nicht gefärbt. Einige der Epidermiszellen schienen gefärbt zu sein. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich nicht um Aktivität in den Zellen, denn die isoliert inkubierte Epidermis zeigte keine GUS-Aktivität in Trichomen, Stomata und Epidermiszellen (B). Die Färbung der Epidermiszellen in (A) könnte an Kontaminationen aus ausgeschnittenen Mesophyllzellen liegen oder daran, dass die Schnitte mehrschichtig waren und hinter den Epidermiszellen liegende Mesophyllzellen durchschienen. In der Petiole fand sich keine Blaufärbung (C). Im Querschnitt durch das Mesophyll zeigte sich sehr starke Expression im Palisadenparenchym und etwas geringere im Schwammparenchym (D).

Zur genaueren Untersuchung der Expression wurde die Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Organen von Tabakpflanzen (transformiert mit FBP:GUS) isoliert und GUS-spezifische Transkripte mittels Northern-Analysen nachgewiesen (Figur 7). Die Isolierung erfolgte wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschrieben. Für die Analyse wurden jeweils 20 bis 40 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA Moleküle wurde die RNA mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino (Anal. Biochem. (1986) 152, 304) beschrieben durchgeführt. Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) radioaktiv markiert. GUS-spezifische Transkripte konnten nur in Sink- und Source Blättern nachgewiesen werden, wohingegen kein positives Signal in Stengeln, Wurzeln und Samen identifiziert werden konnte. Der Vergleich der in Sink- und Source-Blättern erhaltenen  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität zeigt, daß eine vielfach höhere Aktivität in Source-Blättern vorliegt. Histochemische Untersuchungen von Keimlingen ergaben, daß auch in frühen Entwicklungsstadien von Tabakpflanzen eine gleichmäßige blattspezifische Expression gewährleistet ist (Figur 8).

45

## Beispiel 5: Erstellung des Vektors pBin-FBP

Das Promotorfragment wurde mit BamHI/SacI aus pUC 19 ausgeschnitten; die Enden wurden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde das Fragment über ein 1%-iges TAE-Agarosegel elektrophoretisch vom Vektor pUC19 getrennt und mit Glassmilch (BIO 101.1070 Joshua Way, Vista, CA 92083, USA) gereinigt. Es wurde dann in ein EcoRI geschnittenes und mit Klenow-Enzym behandeltes pBin19-Derivat ligiert. Dieses Derivat enthielt somit eine den cy-FBPase-Promotor und die Terminatorsequenz der Octopin-Synthase aus Agrobacterium tumefaciens umfassende Expressionskassette (Figur 9).

15

20

25

30

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: -
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Blattspezifische Expression von Genen in transgenen Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1720 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: Desiree
- (F) GEWEBETYP: Leaf

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1429..1720
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Teil der Leader-Sequenz der cy-FBPase"

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: promoter

(B) LAGE:1..1428

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE:1429

(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Transkriptionsstart"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: TATA\_signal

(B) LAGE:1399..1405

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CAAT\_signal

(B) LAGE:1288..1300

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CCAGCTAATG CTGCTCTTGT CACTCAAAT GATGGTATCC CTCTCGTCAT CCAGTGTGTTG	60
TCAAGTCCTG TTAGGAACAC AGTAAGGATA TAAACAAACA TTTTGTGGTC TTCTTGGTTA	120
TTGAGTGCTT GCTGTTCACT TGTAAAAATT GCACATATAC GTAGTGAGAA ACTCAACTGT	180
TGAGTACCAT TGATCCGTCA ATCTTGTCGA TAACTTTGAT AAGGATATTT CAGGCATCAG	240
ACATGTCACC TCTATAGAAC TTGGTCTTTT TTTTAAAAA TAAAAATAAA AATGTTTGGC	300
ATCATACGAA CTTCTGTTAC TTTAGGCTGT ATCCAGAATA AAATGTTGTT TCCTCATTCT	360
GGAATTAGTT GTTTTGCACA CGGAAGACTT TCGAAATTTA CTAATTGTGT TCGTCCGTCT	420
CAAACCTGGCT CACACTTTGG TGGTCAATTT TACTTCTCAA GGTAAGCAAT TACAGAATAT	480
GAAATGTCGT CTCCTCATAT TTATCCGAAC AATAAAAAAT GATATCTGTT TGCATATGCA	540
TGTAGATCAC ACACCCCCC CCCCCCGCC CCTAGATTCC CTCGATTTAG ATTAAATATA	600
ATCATCTACA AGAATTCCGT TGGGCTTCAT TATGTGTTTT TACATATTCG TTTCTGAACC	660
ACCCCCACCC CGGTGAAAAA CATTGCTCTG CCACTGGCTC AATGTATTGA CACAAATGAA	720
CTTCAAACCTG GGCAGGTGAA TTATGCTCTA GGAGCATTGT ATTATCTATG CAATGCATCA	780
AACAAGGAAG AGATCTTAAA GCCAGAAGTA ATTGATGCAA TCAAAAGTTA TGCAGCTGCA	840
GGTGGAGTTA GTACAAGCTT CAGTAATTTG GCTCAGGCTT TCTTAGATCA ACATGTTCCCT	900
CAGCTTAATT AAAATGGAGG AAACCAAAGA TTATGTTGTA AAATCATTTT CTATCCTAGA	960
TGGTCTATCG GAAACAATTT ATTTATTACT CCTATCCAAT TCATTATATT TTCAAAAGTT	1020



ATGAAGTCCA CGAAATATGT GACGTGGGTA AAGAAGACCC ATGCCAAGCC AGTGGGATAT 1080  
 AGAAACAAAA CATGTAATAA AGAGAACAAA TAATGAGTTT CGAAAAGAAC AGAAGTTAGC 1140  
 ATAAGGACGA GAATCACATT ATCTTAGGTG CCAACCACTA ATCCTATGTA TCATTCTCCT 1200  
 CTTTCCACGT GTCATCCTAC ACTTCCTTTG CCATCAGATT AGATAGCCCG GTTAGTACCT 1260  
 ACACTGTATA TCAAAAAATA CGTAACAATC ATCCAAACAT ATCATCGATC AAAGGATATT 1320  
 TATCTTGATG TGCTTTGCGC GTCCATTGTA ACGAGTTTGG ATGAATTTGA TATACACCCA 1380  
 CTCAGATATC AATATATTTT ATAAAAAGAA ACAAATTGA ATACTAGTAA TATCTATGTA 1440  
 GATATTTATT TTTTCAACAA TCCTGTAAGT TATAAGGATA ACTCACTTAT ATGTGACGTG 1500  
 GATAATGAAG AGCTAGGCAG GCAGTGAGAG ATAGAAACAA ATTAAGCAGA GACGAAAAAC 1560  
 AAATCAGTTA ACAGAATGAC GAATTGGATC ACGCTTTATC TTAGTGCCAA CCACTGATCC 1620  
 CATGCATCAC TCTGCTCTTT CCACGTGGCA TCCTCTGACG TCAGATCAGA TTCCTCTTCT 1680  
 TTCCTTTTTT TTTCTGTATA TATATGAGCA TTTTAGTAGT 1720

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1724 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (iv) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: Desiree
- (F) GEWEBETYP: Leaf

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1433..1724
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Teil der Leader-Sequenz der cy-FBPase"

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..6

(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "BamHI Restriction Site"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGATCCAGCT AATGCTGCTC TTGTCACTCA AAATGATGGT ATCCCTCTCG TCATCCAGTG	60
TTTGTCAAGT CCTGTTAGGA ACACAGTAAG GATATAAACA AACATTTTGT GGTCTTCTTG	120
GTTATTGAGT GCTTGCTGTT CACTTGTTAA AATTGCACAT ATACGTAGTG AGAAACTCAA	180
CTGTTGAGTA CCATTGATCC GTCAATCTTG TCGATAACTT TGATAAGGAT ATTTCAAGCA	240
TCAGACATGT CACCTCTATA GAACTTGGTC TTTT'TTTTA AAAATAAAAA TAAAAATGTT	300
TGGCATCATA CGAACTTCTG TTA'CTTTAGG CTGTATCCAG AATAAAATGT TGTTTCTCA	360
TTCTGGAATT AGTTGTTTTG CACACGGAAG ACTTTCGAAA TTTACTAATT GTGTTCTCC	420
GTCTCAA'CT GGCTCACACT TTGGTGGTCA ATTTTACTTC TCAAGGTAAG CAATTACAGA	480
ATATGAATGT CGCTCTCCTC ATATTTATCC GAACAATAAA AAATGATATC TGTTTGCATA	540
TGCATGTAGA TCACACACCC CCCCCCCCCC CGCCCCTAGA TTCCCTCGAT TTAGATTAAA	600
TATAATCATC TACAAGAATT CCGTTGGGCT TCATTATGIG TTTTACATA TTCGTTTCTG	660
AACCACCCCC ACCCGGIGA AAAACATTGC TCTGCCACTG GCTCAATGTA TTGACACAAA	720
TGAACTTCAA ACTGGGCAGG TGAATTATGC TCTAGGAGCA TTGTATTATC TATGCAATGC	780
ATCAAACAAG GAAGAGATCT TAAAGCCAGA AGTAATTGAT GCAATCAAAA GTTATGCAGC	840
TGCAGGTGGA GTTAGTACAA GCTTCAGTAA TTTGGCTCAG GCTTTCITAG ATCAACATGT	900
TCCTCAGCTT AATTAAAAATG GAGGAAACCA AAGATTATGT TGTA'AAATCA TTTTCTATCC	960
TAGATGGTCT ATCGGAAACA ATTTATTTAT TACTCCTATC CAATTCATTA TATTTTCAAA	1020
AGTTATGAAG TCCACGAAAT ATGTGACGTG GGTAAAGAAG ACCCATGCCA AGCCAGTGGG	1080
ATATAGAAAC AAAACATGTA ATAAAGAGAA CAAATAATGA GTTTCGAAAA GAACAGAAGT	1140
TAGCATAAGG ACGAGAATCA CATTATCTTA GGTGCCAACC ACTAATCCTA TGTATCATTC	1200
TCCTCTTTCC ACGTGCATC CTACACTTCC TTTGCCATCA GATTAGATAG CCCGGTTAGT	1260
ACCTACACTG TATATCAAAA AATACGTAAC AATCATCCAA ACATATCATC GATCAAAGGA	1320
TATTTATCTT GATGTGCTTT CGCGTCCAT TGTAACGAGT TTGGATGAAT TTGATATACA	1380
CCCACTCAGA TATCAATATA TTTTATAAAA AGAAACAAAA TTGAATACTA GTAATATCTA	1440

TGTAGATATT TATTTTTTCA ACAATCCTGT AAGTTATAAG GATAACTCAC TTATATGTGA 1500  
 CGTGGATAAT GAAGAGCTAG GCAGGCAGTG AGAGATAGAA ACAAATTAAG CAGAGACGAA 1560  
 AAACAAATCA GTTAACAGAA TGACGAATTG GATCACGCTT TATCTTAGTG CCAACCACTG 1620  
 ATCCCATGCA TCACTCTGCT CTTTCCACGT GGCATCCTCT GACGTCAGAT CAGATTCCTC 1680  
 TTCTTTCTTT TTTTTTCTG TATATATATG AGCATTTTAG TAGT 1724

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1109 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (iv) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: Desiree
- (F) GEWEBETYP: Leaf

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..6
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "EcoRI Restriction Site"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCGGTT GGGCTTCATT ATGIGTTTTT ACATATTCGT TTCTGAACCA CCCCCACCCC 60  
 GGTGAAAAC ATTGCTCTGC CACTGGCTCA ATGTATTGAC ACAAATGAAC TTCAAACCTGG 120  
 GCAGGTGAAT TATGCTCTAG GAGCATTGTA TTATCTATGC AATGCATCAA ACAAGGAAGA 180  
 GATCTTAAAG CCAGAAGTAA TTGATGCAAT CAAAAGTTAT GCAGCTGCAG GTGGAGTTAG 240  
 TACAAGCTTC AGTAATTGG CTCAGGCTTT CTTAGATCAA CATGTTCCCTC AGCTTAATTA 300  
 AAATGGAGGA AACCAGAGAT TATGTTGTAA AATCATTTTC TATCCTAGAT GGTCTATCGG 360  
 AAACAATTTA TTTATTACTC CTATCCAATT CATTATATTT TCAAAAGTTA TGAAGTCCAC 420  
 GAAATATGTG ACGTGGGTAA AGAAGACCCA TGCCAAGCCA GTGGGATATA GAAACAAAAC 480

ATGTAATAAA GAGAACAAAT AATGAGTTTC GAAAAGAACA GAAGTTAGCA TAAGGACGAG	540
AATCACATTA TCTTAGGTGC CAACCACTAA TCCTATGTAT CATTCTCCTC TTTCCACGTG	600
TCATCCTACA CTTCCCTTGC CATCAGATTA GATAGCCCGG TTAGTACCTA CACTGTATAT	660
CAAAAATAC GTAACAATCA TCCAAACATA TCATCGATCA AAGGATATTT ATCTTGATGT	720
GCTTTGCGCG TCCATTGTAA CGAGTTTGA TGAATTTGAT ATACACCCAC TCAGATATCA	780
ATATATTTTA TAAAAAGAAA CAAAATTGAA TACTAGTAAT ATCTATGTAG ATATTTATTT	840
TTTCAACAAT CCTGTAAGTT ATAAGGATAA CTCACCTATA TGTGACGTGG ATAATGAAGA	900
GCTAGGCAGG CAGTGAGAGA TAGAAACAAA TTAAGCAGAG ACGAAAAACA AATCAGTTAA	960
CAGAATGACG AATTGGATCA CGCTTTATCT TAGTGCCAAC CACTGATCCC ATGCATCACT	1020
CTGCTCTTTC CACGTGGCAT CCTCTGACGT CAGATCAGAT TCCTCTTCTT TCITTTTTTTT	1080
TTCTGTATAT ATATGAGCAT TTTAGTAGT	1109

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1428 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: Desiree
- (F) GEWEBETYP: Leaf

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CCAGCTAATG CTGCTCTTGT CACTCAAAT GATGGTATCC CTCTCGTCAT CCAGTGTTTG	60
TCAAGTCCTG TTAGGAACAC AGTAAGGATA TAAACAAACA TTTTGTGGTC TTCTTGGTTA	120
TTGAGTGCTT GCTGTTCACT TGTTAAAATT GCACATATAC GTAGTGAGAA ACTCAACTGT	180
TGAGTACCAT TGATCCGTCA ATCTTGTCGA TAACTTTGAT AAGGATATTT CAGGCATCAG	240

ACATGTCACC TCTATAGAAC TTGGTCTTTT TTTTAAAAA TAAAAATAAA AATGTTTGGC	300
ATCATACGAA CTTCTGTAC TTTAGGCTGT ATCCAGAATA AAATGTTGTT TCCTCATCT	360
GGAATTAGTT GTTTTGCACA CGGAAGACTT TCGAAATTTA CTAATTGTTGTT TCGTCCGTCT	420
CAAACCTGGCT CAACTTTGG TGGTCAATTT TACTTCTCAA GGTAAGCAAT TACAGAATAT	480
GAATGTCGCT CTCCTCATAT TTATCCGAAC AATAAAAAAT GATATCTGTT TGCATATGCA	540
TGTAGATCAC ACACCCCCC CCCCCCGCC CCTAGATTCC CTCGATTTAG ATTAAATATA	600
ATCATCTACA AGAATTCCGT TGGGCTTCAT TATGTGTTTT TACATATTCG TTTCTGAACC	660
ACCCCCACCC CGGTGAAAAA CATTGCTCTG CCACTGGCTC AATGTATTGA CACAAATGAA	720
CTTCAAACCTG GGCAGGTGAA TTATGCTCTA GGAGCATTGT ATTATCTATG CAATGCATCA	780
AACAAGGAAG AGATCTTAAA GCCAGAAGTA ATTGATGCAA TCAAAAAGTTA TGCAGCTGCA	840
GGTGGAGTTA GTACAAGCTT CAGTAATTTG GCTCAGGCTT TCTTAGATCA ACATGTTCTT	900
CAGCTTAATT AAAATGGAGG AAACCAAAGA TTATGTTGTA AAATCATTTT CTATCCTAGA	960
TGGTCTATCG GAAACAATTT ATTTATTACT CCTATCCAAT TCATTATATT TTCAAAGTT	1020
ATGAAGTCCA CGAAATATGT GACGTGGGTA AAGAAGACCC ATGCCAAGCC AGTGGGATAT	1080
AGAAACAAAA CATGTAATAA AGAGAACAAA TAATGAGTTT CGAAAAGAAC AGAAGTTAGC	1140
ATAAGGACGA GAATCACATT ATCTTAGGTG CCAACCACTA ATCCTATGTA TCATTCTCCT	1200
CTTTCCACGT GTCATCCTAC ACTTCCTTTG CCATCAGATT AGATAGCCCG GTTAGTACCT	1260
AACTGTATA TCAAAAAATA CGTAACAATC ATCCAAACAT ATCATCGATC AAAGGATATT	1320
TATCTTGATG TGCTTTGCC GTCCATTGTA ACGAGTTTG ATGAATTGTA TATACACCCA	1380
CTCAGATATC AATATATTTT ATAAAAAGAA ACAAATTTGA ATACTAGT	1428

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 817 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Solanum tuberosum*

(B) STAMM: Desiree

(F) GEWEBETYP: Leaf

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: 1..6

(D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "EcoRI Restriction Site"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GAATTCCGTT GGGCTTCATT ATGTGTTTTT ACATATTGCT TTCTGAACCA CCCCCACCCC	60
GGTGAAAAAC ATTGCTCTGC CACTGGCTCA ATGTATTGAC ACAAATGAAC TTCAAACCTGG	120
GCAGGTGAAT TATGCTCTAG GAGCATTGTA TTATCTATGC AATGCATCAA ACAAGGAAGA	180
GATCTTAAAG CCAGAAGTAA TTGATGCAAT CAAAAGTTAT GCAGCTGCAG GTGGAGTTAG	240
TACAAGCTTC AGTAATTTGG CTCAGGCTTT CTTAGATCAA CATGTTCCCTC AGCTTAATTA	300
AAATGGAGGA AACCAAAGAT TATGTTGTAA AATCATTTTC TATCCTAGAT GGTCTATCGG	360
AAACAATTTA TTTATTACTC CTATCCAATT CATTATATTT TCAAAAGTTA TGAAGTCCAC	420
GAAATATGTG ACGTGGGTAA AGAAGACCCA TGCCAAGCCA GTGGGATATA GAAACAAAAC	480
ATGTAATAAA GAGAACAAAT AATGAGTTTC GAAAAGAACA GAAGTTAGCA TAAGGACGAG	540
AATCACATTA TCTTAGGTGC CAACCACTAA TCCTATGTAT CATTCTCCTC TTTCCACGIG	600
TCATCCTACA CTTCTTTGTC CATCAGATTA GATAGCCCGG TTAGTACCTA CACTGTATAT	660
CAAAAATAC GTAACAATCA TCCAAACATA TCATCGATCA AAGGATATTT ATCTTGATGT	720
GCTTTGCGCG TCCATTGTAA CGAGTTTGGA TGAATTTGAT ATACACCCAC TCAGATATCA	780
ATATATTTTA TAAAAAGAAA CAAAATTGAA TACTAGT	817

## Patentansprüche

1. Promotor, dadurch gekennzeichnet, daß er in Pflanzen eine  
5 blattspezifische Expression einer von ihm kontrollierten  
codierenden Nucleotidsequenz bewirkt.
2. Promotor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er ab-  
geleitet ist von einer regulativen Nucleotidsequenz, die un-  
10 ter nativen Bedingungen die Expression eines Proteins steu-  
ert, das an einem blattspezifischen Stoffwechselprozeß betei-  
ligt ist.
3. Promotor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der  
15 blattspezifische Stoffwechselprozeß die photosynthetische  
Saccharose-Biosynthese ist.
4. Promotor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß er im wesentlichen eine Promotorsequenz einer  
20 cytosolischen Fructose-1,6-Bisphosphatase aus Pflanzen um-  
faßt.
5. Promotor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er die  
25 Sequenz des Promotors cytosolischer Fructose-1,6-Bisphospha-  
tase aus blattspezifischen Mesophyllzellen von Pflanzen der  
Gattung Solanum oder ein funktionelles Äquivalent davon um-  
faßt.
6. Promotor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekenn-  
30 zeichnet, daß er die Nukleotidsequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID  
NO:2 oder SEQ ID NO:3 oder ein funktionelles Äquivalent davon  
umfaßt.
7. Promotor nach Anspruch 6, umfassend eine Nucleotidsequenz von  
35 Nucleotid +1 bis +1428 (SEQ ID NO:4) oder +1 bis +817 (SEQ ID  
NO:5) oder ein funktionales Äquivalent dieser Nucleotidse-  
quenzen.
8. Expressionskassette, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenig-  
40 stens eine in einem der Ansprüche 1 bis 7 definierte Promo-  
torsequenz umfaßt.
9. Expressionskassette nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,  
45 daß sie eine codierende Nucleotid-Sequenz umfaßt, die in  
Pflanzen Resistenz oder eine Steigerung der Photosynthese-  
leistung der Pflanze vermittelt.

10. Rekombinanter Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine in Anspruch 8 oder 9 definierte Expressionskassette umfaßt.
11. Vektor nach Anspruch 10, ausgewählt unter den Plasmiden  
5      FBP:GUS und pBin-FBP.
12. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er einen rekombinanten Vektor nach einem der Ansprüche 10 oder 11 enthält.
- 10 13. Mikroorganismus nach Anspruch 12 aus der Gattung Agrobacterium und insbesondere der Art Agrobacterium tumefaciens.
14. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 10 oder 11 oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 12 oder 13 zur  
15      Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die transformierte Pflanze ausgewählt ist unter Kulturpflanzen,  
20      wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspecies.
- 25 16. Verwendung eines Promotors nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
  - a) zur Herstellung eines pflanzlichen Bioreaktors;
  - b) zur Veränderung der Zusammensetzung von Pflanzeninhaltsstoffen;
  - c) zur Manipulation des pflanzlichen Stoffwechsels; und
  - 30      d) zur Übertragung von Resistenzgenen auf Pflanzen.
17. Transgene Pflanze, transformiert mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 10 oder 11 oder mit einem Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, oder transgene Zellen, Gewebe, Teile oder transgenes Vermehrungsgut davon.  
35
18. Transgene Pflanze nach Anspruch 17, ausgewählt unter Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate,  
40      Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspecies.
19. Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen nach einem der Ansprüche 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man  
45      Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 10 oder 11 oder mit einem Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13



transformiert, die transformierten Zellen, Gewebe, Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und gegebenenfalls aus der Kultur Pflanzen regeneriert.

- 5 20. Verfahren zur Isolierung eines blattspezifischen Promotors, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) eine pflanzliche genomische Bank mit cytFBPase (EMBL Nr. X76946) cDNA hybridisiert,
  - b) positive Klone isoliert und
  - 10 c) die isolierten Klone auf Promotor-Aktivität testet.
21. Nucleinsäuresequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 und 5, und funktionalen Äquivalenten davon.

15

20

25

30

35

40

45

1/12

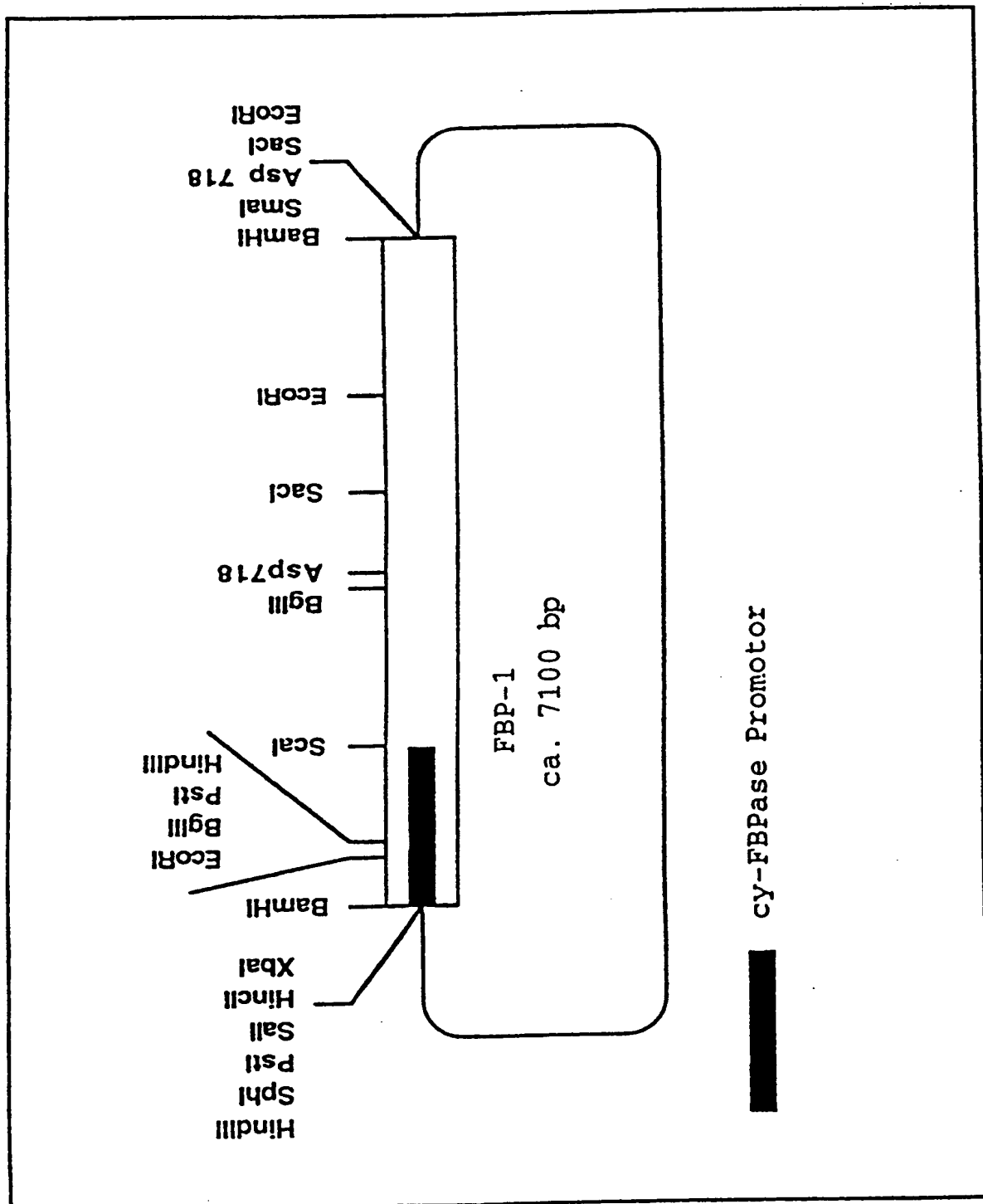


Fig. 1A

2/12

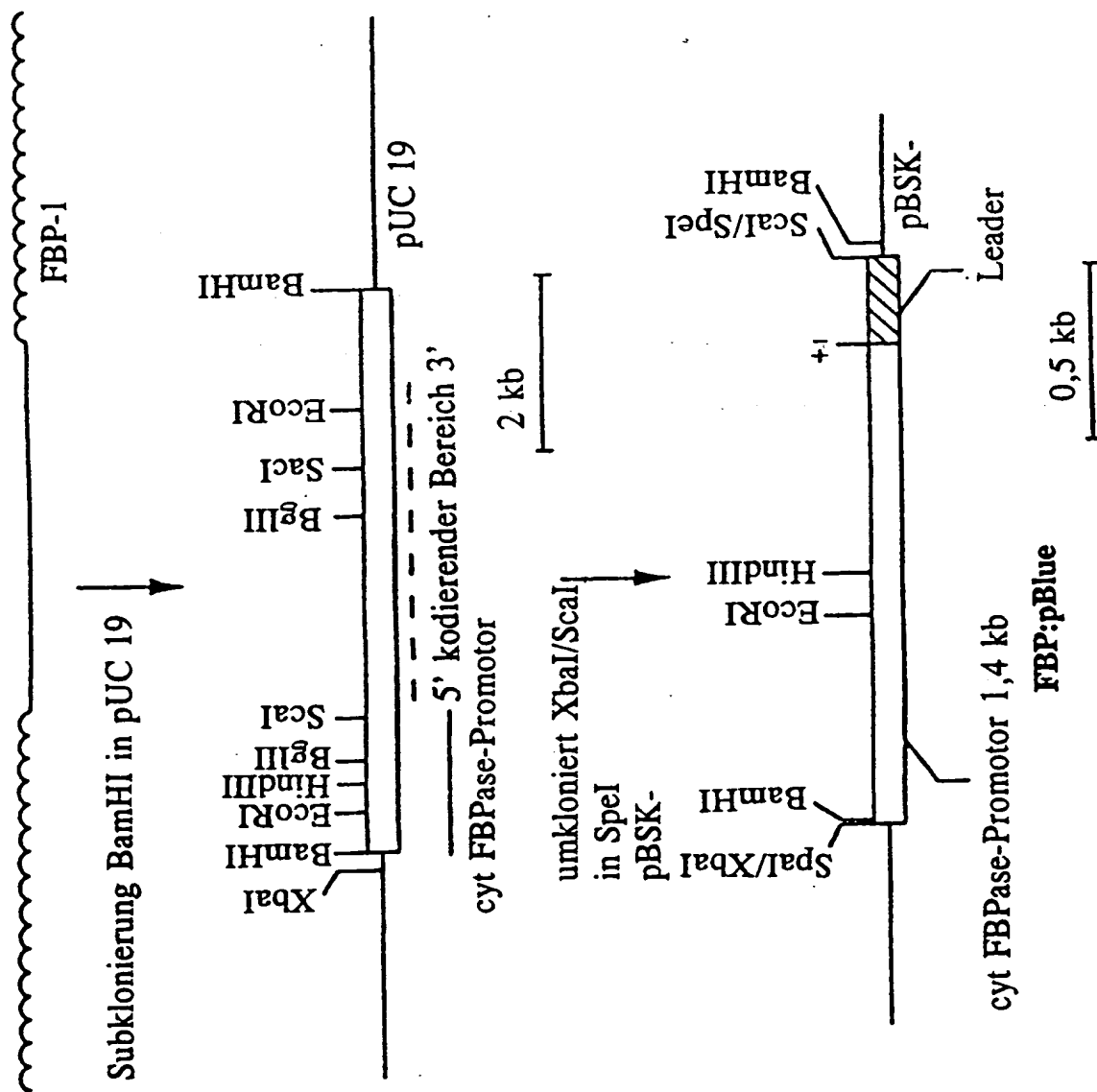


Fig. 1B

GGATCCAGCTAATGCTGCTCTTGCTACTCAAAATGATGGTATCCCTCTCGTCATCCAGTGTGTTGTCAAG  
TCCTGTTAGGAACACAGTAAGGATATAAAACAAACATTTTGTGGTCTTCTTGTTATTGAGTGCTTGCTGTTCACT  
TGTTAAATTTGCACATATACGTAGTGAGAACTCAACTGTTGAGTACCATTGATCCGTCAATCTTGTCGATAACT  
TTGATAAGGATATTTTCAGGCATCAGACATGTCACCTCTATAGAACTTGGTCTTTTTTTTTTAAAAATAAAAAATAAA  
AATGTTTGGCATCATACGAACTTCTGTTACTTTAGGCTGTATCCAGAATAAAATGTTGTTTCTCATTCTGGAAT  
TAGTTGTTTTGACACGGAAGACTTTCGAAATTTACTAATTGTGTTTCGTCCGTCTCAAACCTGGCTCACACTTTGG  
TGGTCAATTTTACTTCTCAAGGTAAGCAATTACAGAATATGAATGTCGCTCTCCTCATATTTATCCGAACAATAA  
AAAATGATATCTGTTTGCATATGCATGTAGATCACACACCCCCCCCCCCCCCGCCCCCTAGATTCCCTCGATTTAG  
ATTAAATATAATCATCTACAAGAATTCGGTTGGGCTTCATTATGTGTTTTTACATATTCGTTTCTGAACACCCCC  
CACCCCGGTGAAAAACATTGCTCTGCCACTGGCTCAATGTATTGACACAAATGAACTTCAAACCTGGGCAGGTGAA  
TTATGCTCTAGGAGCATTGTATTATCTATGCAATGCATCAAACAAGGAAGAGATCTTAAAGCCAGAAGTAATTGA  
TGCAATCAAAAAGTTATGCGAGCTGCAGGTGGAGTTAGTACAAGCTTCAGTAATTTGGCTCAGGCTTTCTTAGATCA  
ACATGTTCCCTCAGCTTAATTAAATGGAGGAAACCAAAGATTATGTTGTAAAATCATTCTTCTATCCTAGATGGTC  
TATCGGAAACAATTTATTTATTACTCCTATCCAATTCATTATATTTTCAAAAAGTTATGAAGTCCACGAAATATGT  
GACGTGGGTAAAGAAGACCCATGCCAAGCCAGTGGGATATAGAAACAAAACATGTAATAAAGAGAACAAATAATG  
AGTTTCGAAAAAGAACAGAAGTTAGCATAAGGACGAGAATCACATTATCTTAGGTGCCAACCCTAATCCTATGTA  
TCATTCTCCTCTTTCCACGTGTCATCCTACACTTCCTTTGCCATCAGATTAGATAGCCCGTTAGTACCTACACT  
GTATATCAAAAAATACGTAACAATCATCCAACATATCATCGATCAAAGGATATTTATCTTGATGTGCTTTTCGCC  
GTCCATTGTAACGAGTTTGGATGAATTTGATATACACCCACTCAGATATCAATATATTTTATAAAAAGAAACAAA  
ATTGAATACTAGTAATATCTATGTAGATATTTATTTTTTCAACAATCCTGTAAGTTATAAGGATAACTCACTTAT  
ATGTGACGTGGATAATGAAGAGCTAGGCAGGCAGTGAGAGATAGAAACAAATTAAGCAGAGACGAAAAACAAATC  
AGTTAACAGAATGACGAATTGGATCACGCTTTATCTTAGTGCCAACCCTGATCCCATGCATCACTCTGCTCTTT  
CCACGTGGCATCCTCTGACGTCAGATCAGATTCCTCTCTCTCTTTTTTTTTTCTGTATATATATGAGCATTTTA  
GTAGT

**ERSATZBLATT (REGEL 26)**

4/12

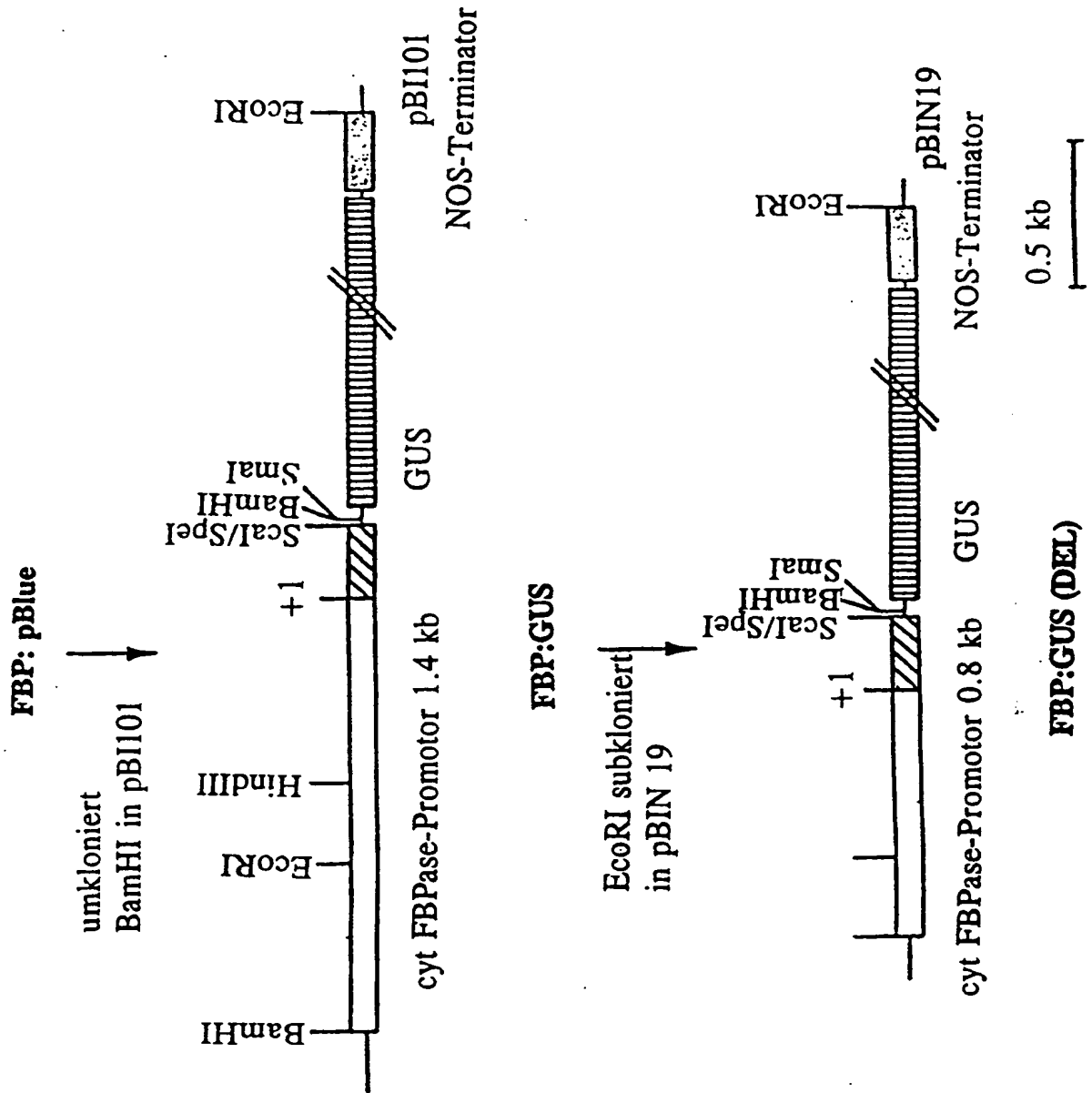
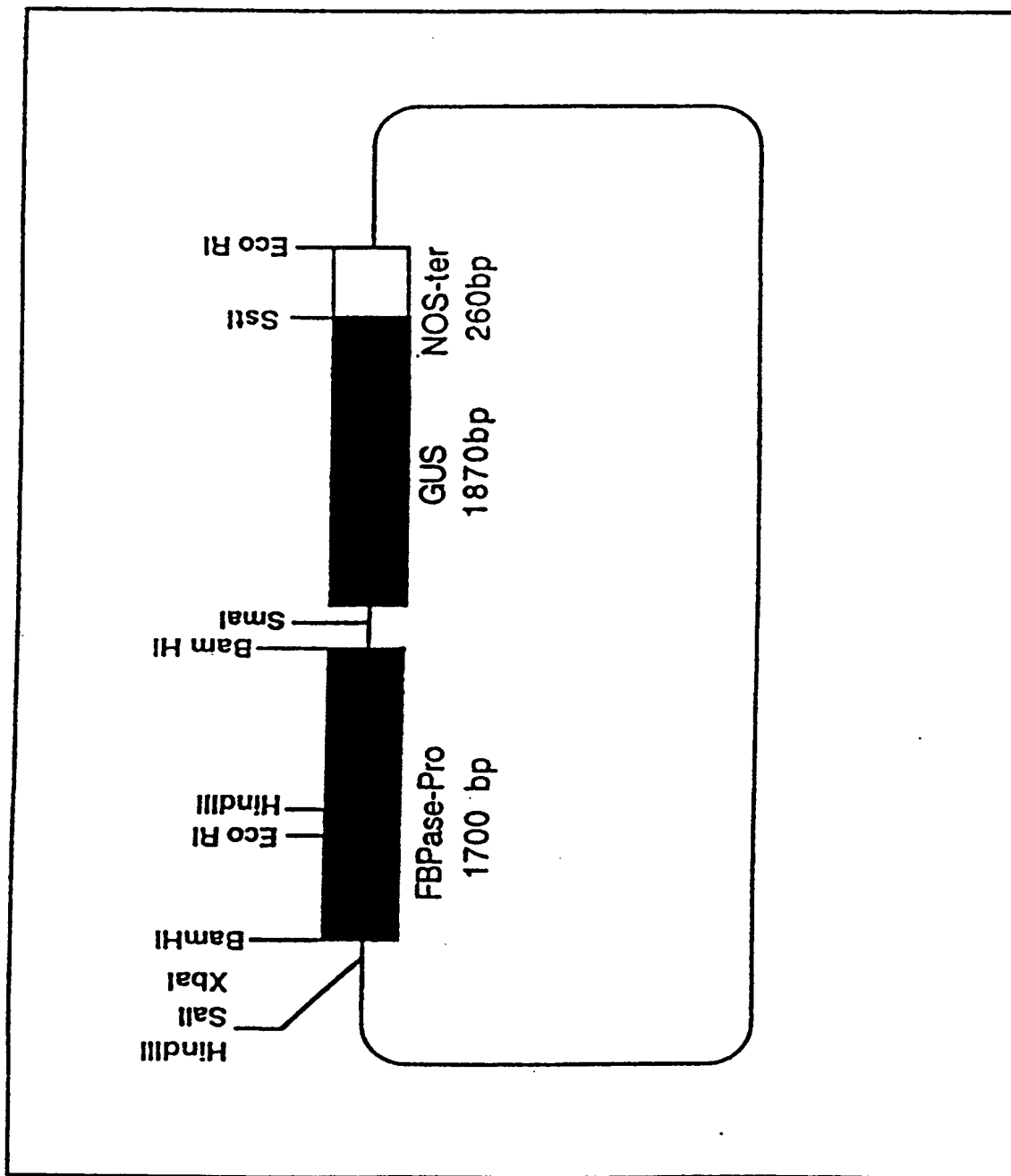


Fig. 3A

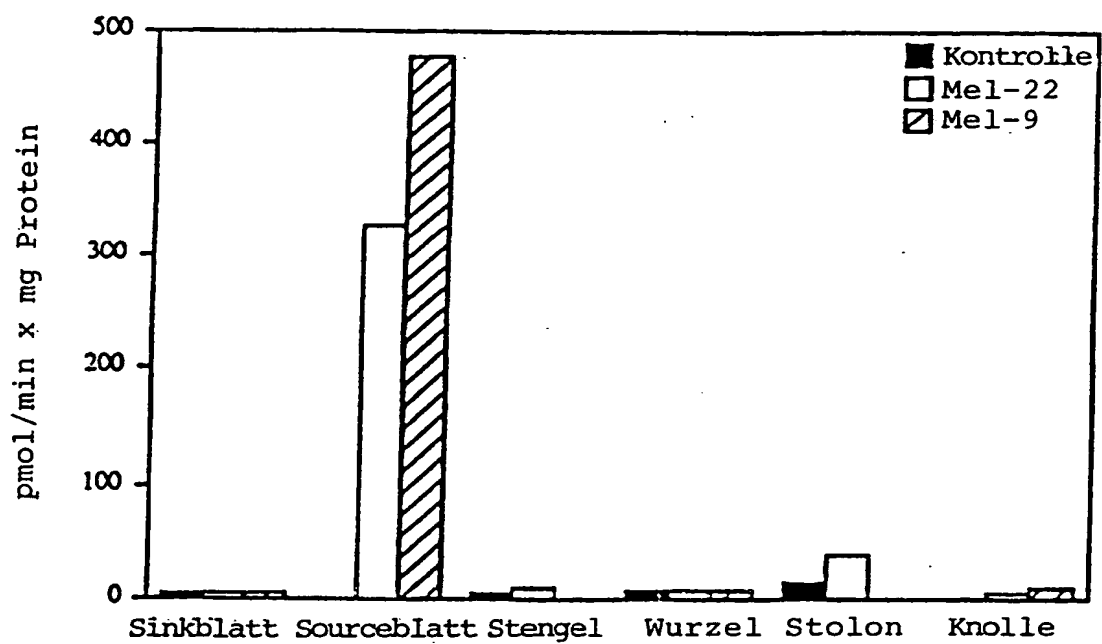
5/12

Fig. 3B



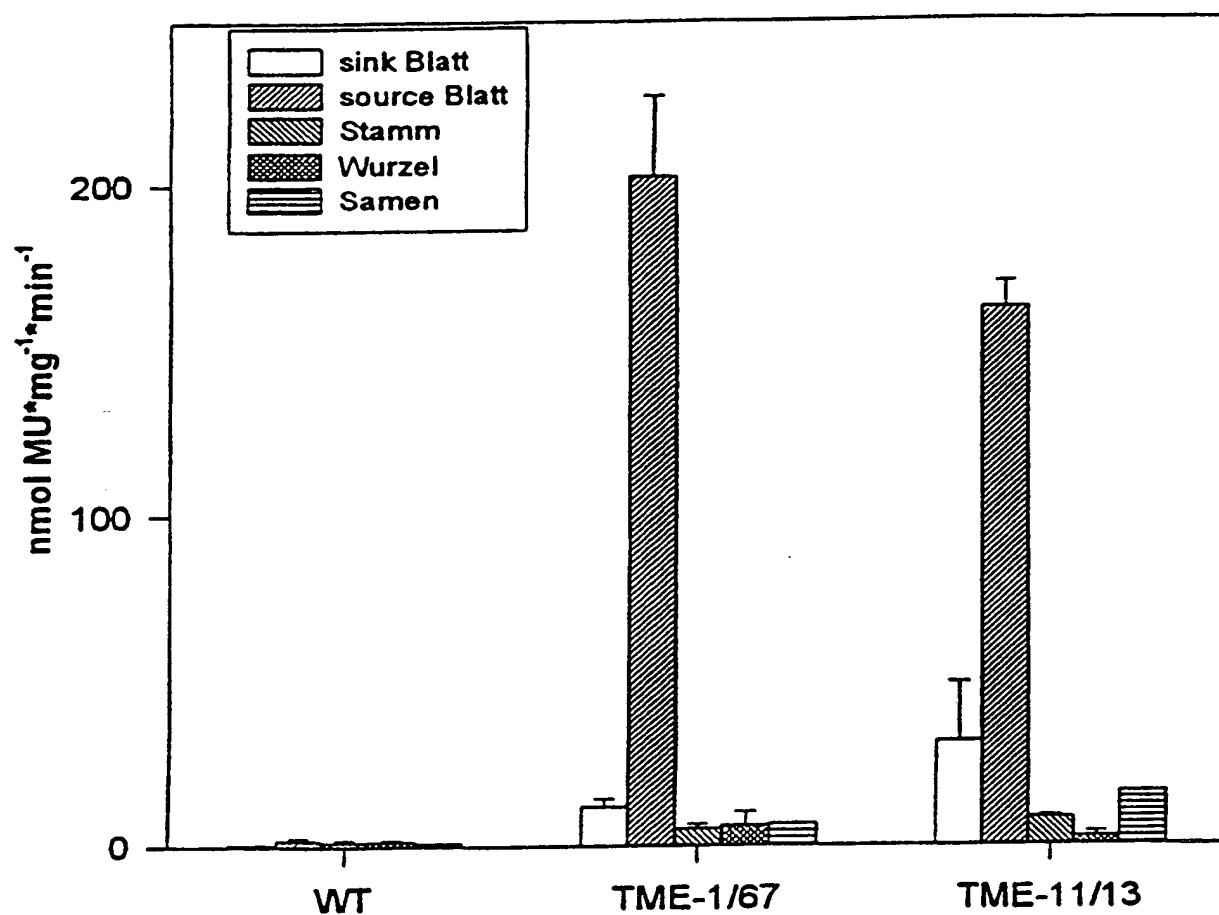
6/12

Fig. 4



7/12

Fig. 5



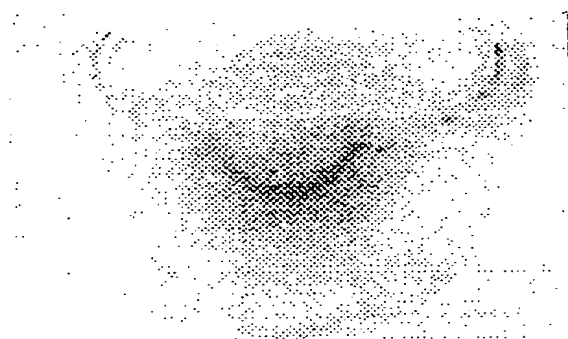
ERSATZBLATT (REGEL 26)



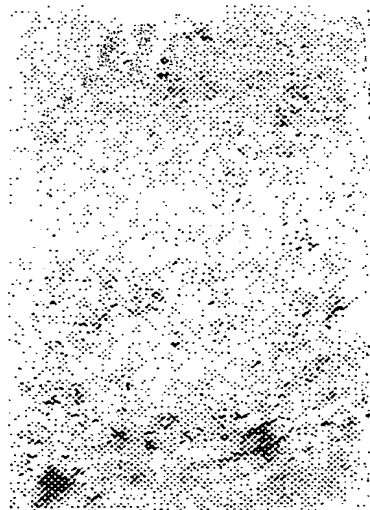
Fig. 6



A



C

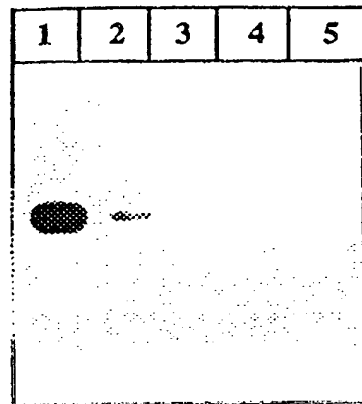


B



D

9/12



1: Sourceblatt

2: Sinkblatt

3: Stengel

4: Wurzel

5: Samen

Fig. 7

10/12

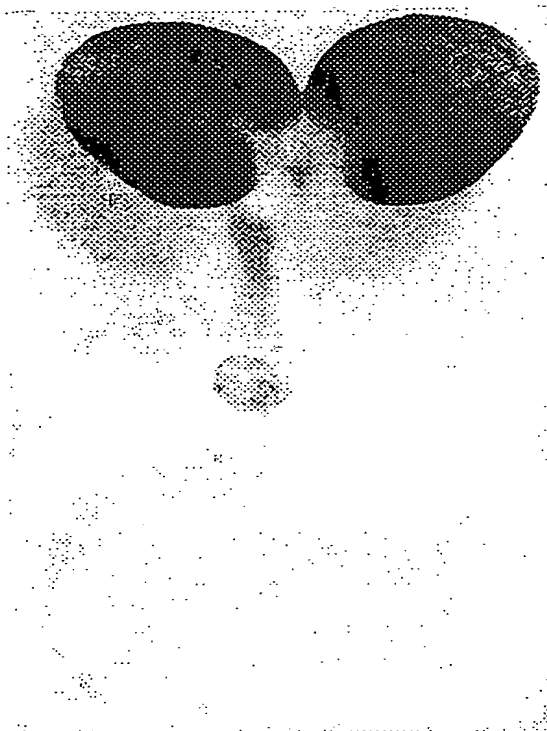
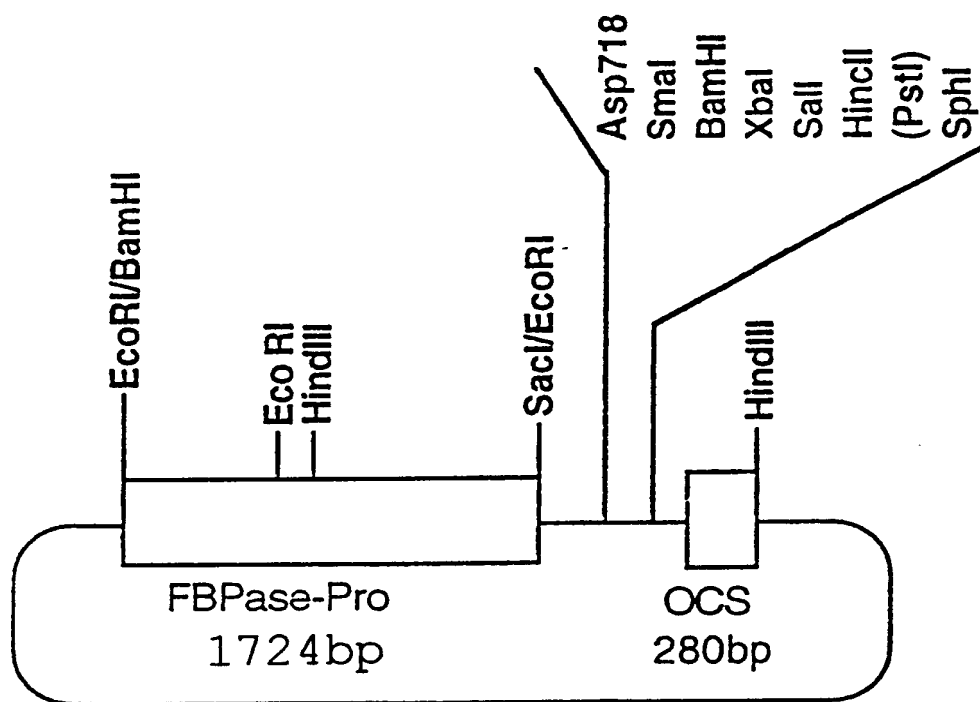


Fig. 3

11/12

Fig. 9



12/12

```

aaatcagtta acagaatgac gaattggatc acgctttatc ttagtgccaa ccactgatcc 60
catgcatcac tctgctcttt ccacgtggca tcctctgacg tcagatcaga ttccctcttct 120
ttcttttttt ttctgtata tatatgagca ttttagtagt actgcgtgcc caatctctta 180
cataaaaaac gaagcacgat ggatcacgcg gcggatcgac accggacgga ttgatgaca 240
ataacaaggc ttgtgttgaa tgagcagacg aagcacccctg aatcccgtgg agacttcagt 300
atcttgctca gtcacattgt tcttggtgc aagttcgtat gcactgctgt taacaaggca 360
ggtttagcca aacttctagg acttgctggt gagactaatg tgcagggaga agatcaaaag 420
aaacttgatg tactctcaaa tgaagtgttt atcaaggctt tggttagcag taaccgaaca 480
tgcattcttg tctctgaaga agatgaagaa gccacatttg ttaggccagc taaccgtgga 540
aaatactgtg tagtttttga tctctggat ggatcatcga acattgattg tgggtgttct 600
attggaacga tctttggaat ttacatgac aaagacggtc atgaaccaac actagatgat 660
gtcttgcaac ctgggatgaa catgttagct gctgggttact gcatgtatgg agttcttgt 720
acgttagttt tgagcactgg atctggagtt aatgggttta cccttgatcc ctctcttggc 780
gagttcatcc taactcatcc tgacatcaag attcctaaga aagggaagat ttatttcagt 840
aatgaaggaa atgccaagaa ctgggacagt ccaacatcca aatatgtgca gagctgcaag 900
tatcccgctg atggttcttc accaaaatct ttgagatata ttggaagtat ggttgctgat 960
gttcatcgtc cattactcta tggaggcatc ttcttgtaac ccggagataa gaaaagcccc 1020
aacgggaaac tgagggttct ctatgaagta ttcccatgt catttctgat ggaacaagca 1080
ggaggccaag catttactgg gaagcaacgg gcacttgact tagttccaga gaagatacac 1140
gaacgctctc ctatatctct tggtagttat gatgatgttg aggagatcaa aaagctctac 1200
gctgctgaag agcaaaaactg atagatgtat ctataccatg taatcacctc actactcttg 1260
ctggtgcaga tatcaaatct ctcaaatcac agcaagttgt tactgtttat gttgcacaat 1320
agctgctgtg atcgataaat acgttcacat tactgggtgt tctaactttt tgtcttgaag 1380
tatctatttc tcatcaacaa taaaatgttg aatagagaag ttctggctta ttattgttat 1440
caaagtctct ttgtaatgtc atccatttag aatcaagcta atttttt 1487

```

Fig. 10

ERSATZBLATT (REGEL 26)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05900

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N15/82 C12N1/21 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARRAK H. ET AL.: "The expression of nuclear genes encoding plastid ribosomal proteins precedes the expression of chloroplast genes during early phases of chloroplast development" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 108, no. 2, June 1995, pages 685-692, XP002058909 see in particular page 688, left-hand column, paragraph 2	1,2
X	VALDEZ-ALARCON J. ET AL.: "Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase-encoding gene" GENE, vol. 170, no. 2, 8 May 1996, pages 217-222, XP004042829 see the whole document	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 March 1998

Date of mailing of the international search report

26/03/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. Jonal Application No

PCT/EP 97/05900

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 18169 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 16 September 1993 cited in the application see the whole document ---	1-3, 8-10, 12-19
X	WO 91 05054 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ;RHONE POULENC LTD (GB); TWYFORD SEEDS LTD) 18 April 1991 see the whole document ---	1-3,6, 8-10, 12-19,21 20
A		
X	ZRENNER R. ET AL.: "Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield" THE PLANT JOURNAL, vol. 9, no. 5, May 1996, pages 671-681, XP002058910 see the whole document ---	20
A		
A	WO 96 21737 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;SONNEWALD UWE (DE); KOSSMANN JENS () 18 July 1996 see the whole document -----	1-19,21  1-21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05900

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9318169 A	16-09-93	DE 4207358 A	09-09-93
		AU 671099 B	15-08-96
		CA 2112800 A	16-09-93
		EP 0584324 A	02-03-94
		HU 67084 A	30-01-95
		US 5538879 A	23-07-96
WO 9105054 A	18-04-91	CA 2066652 A	30-03-91
		EP 0494215 A	15-07-92
		JP 7501921 T	02-03-95
WO 9621737 A	18-07-96	DE 19502053 A	18-07-96
		AU 4485896 A	31-07-96
		CA 2209932 A	18-07-96
		EP 0802982 A	29-10-97

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05900

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/55 C12N15/82 C12N1/21 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HARRAK H. ET AL.: "The expression of nuclear genes encoding plastid ribosomal proteins precedes the expression of chloroplast genes during early phases of chloroplast development" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 108, Nr. 2, Juni 1995, Seiten 685-692, XP002058909 * siehe insbes. S.688, linke Spalte., 2. Abs. *	1,2
X	VALDEZ-ALARCON J. ET AL.: "Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase-encoding gene" GENE, Bd. 170, Nr. 2, 8. Mai 1996, Seiten 217-222, XP004042829 siehe das ganze Dokument	1-3



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. März 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/03/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05900

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 18169 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 16.September 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1-3, 8-10, 12-19
X	WO 91 05054 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ;RHONE POULENC LTD (GB); TWYFORD SEEDS LTD) 18.April 1991 siehe das ganze Dokument ----	1-3,6, 8-10, 12-19,21 20
A		20
X	ZRENNER R. ET AL.: "Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield" THE PLANT JOURNAL, Bd. 9, Nr. 5, Mai 1996, Seiten 671-681, XP002058910 siehe das ganze Dokument ----	20
A		1-19,21
A	WO 96 21737 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;SONNEWALD UWE (DE); KOSSMANN JENS ()) 18.Juli 1996 siehe das ganze Dokument -----	1-21

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05900

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9318169 A	16-09-93	DE 4207358 A	09-09-93
		AU 671099 B	15-08-96
		CA 2112800 A	16-09-93
		EP 0584324 A	02-03-94
		HU 67084 A	30-01-95
		US 5538879 A	23-07-96
WO 9105054 A	18-04-91	CA 2066652 A	30-03-91
		EP 0494215 A	15-07-92
		JP 7501921 T	02-03-95
WO 9621737 A	18-07-96	DE 19502053 A	18-07-96
		AU 4485896 A	31-07-96
		CA 2209932 A	18-07-96
		EP 0802982 A	29-10-97

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**